

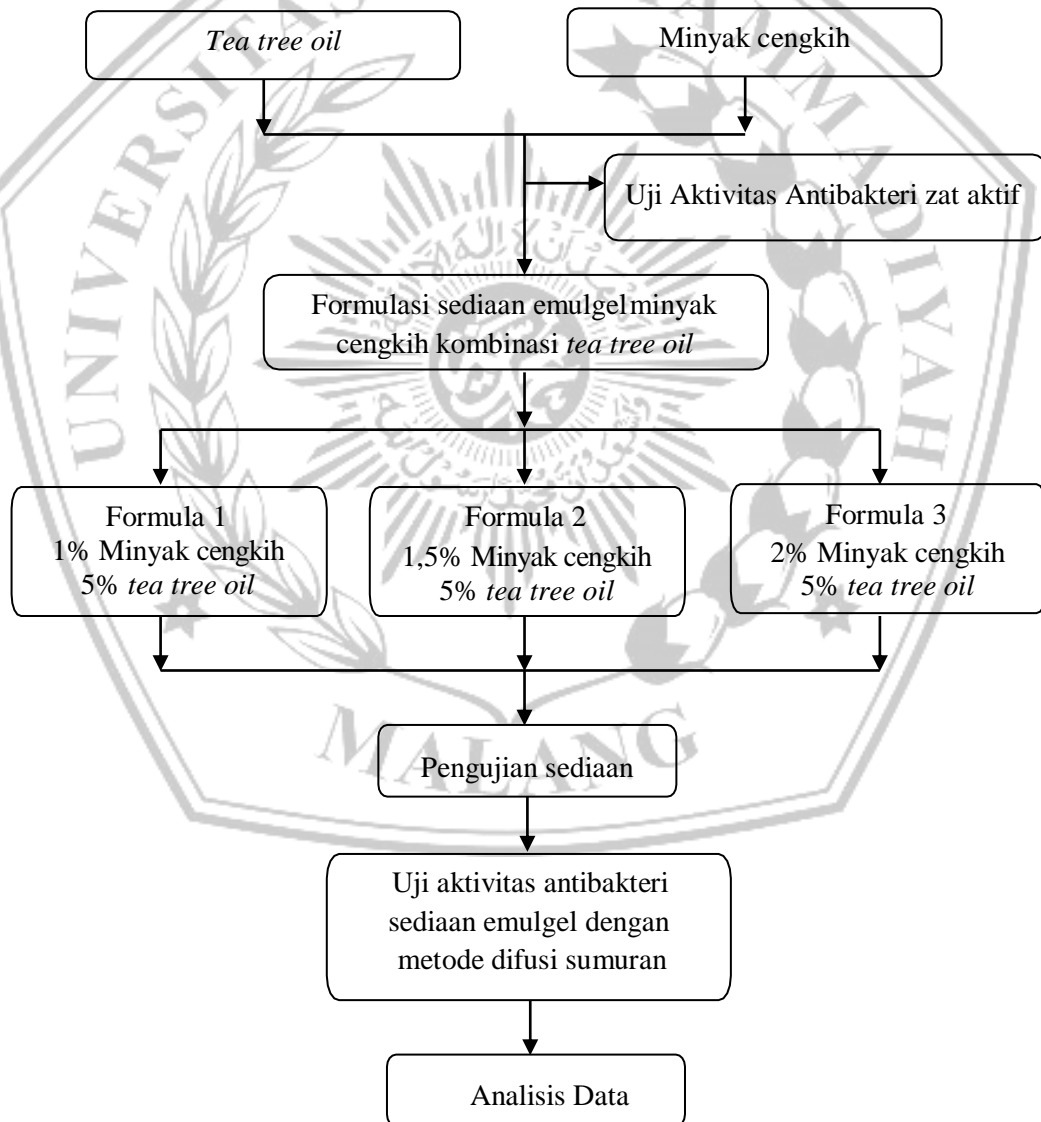
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental yaitu uji aktivitas antibakteri. Uji aktivitas bakteri menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas dan efektifitas sediaan emulgel minyak cengkih kombinasi *tea tree oil* dengan konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2% terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium Acnes*.

4.1.1 Desain Penelitian



Gambar 4.1 Skema Kerja Penelitian

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Formulasi sediaan emulgel minyak cengkih kombinasi *tea tree oil* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Malang dan uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang, penelitian dilakukan pada bulan Juni 2019 - Oktober 2019.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini Variabel bebas yang digunakan adalah minyak cengkih 1%, 1,5% dan 2%. Sedangkan, untuk *tea tree oil* digunakan kadar yang sama dari ketiga formula yaitu 5%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing formula yang dihasilkan dengan metode difusi sumuran.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan aktif yang akan digunakan pada penelitian ini adalah minyak cengkih dan *tea tree oil* yang diperoleh dari PT. Nusaroma Essensia Indonesia

4.4.2 Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Propionibacterium acnes*, yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.3 Bahan Sediaan Formulasi Emulgel

Bahan yang digunakan untuk sediaan emulgel ini adalah *carbomer* (PT.Brataco Chemical), TEA (PT.Brataco Chemical), Span 20 (PT.Brataco Chemical), Tween 80 (PT.Brataco Chemical), propilen glikol (PT.Brataco Chemical), BHT (PT.Brataco Chemical), nipagin (PT.Brataco Chemical), nipasol (PT.Brataco Chemical), DMSO (PT.Brataco Chemical) dan aquadest (PT.Brataco Chemical).

4.4.4 Alat Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah Neraca analitikal

digital (*Metter Toledo*) , inkubator, LAF (Laminar Air Flow), autoklaf.

4.5 Formulasi Emulgel

Dalam penelitian terdapat 3 rancangan formula yang akan dilakukan pada formulasi sediaan emulgel, agar dapat membandingkan aktivitas dari masing-masing formula yang dibuat terhadap pertumbuhan bakteri.

Tabel IV.1 Formulasi Emulgel Minyak Cengkih dan *Tea Tree Oil*

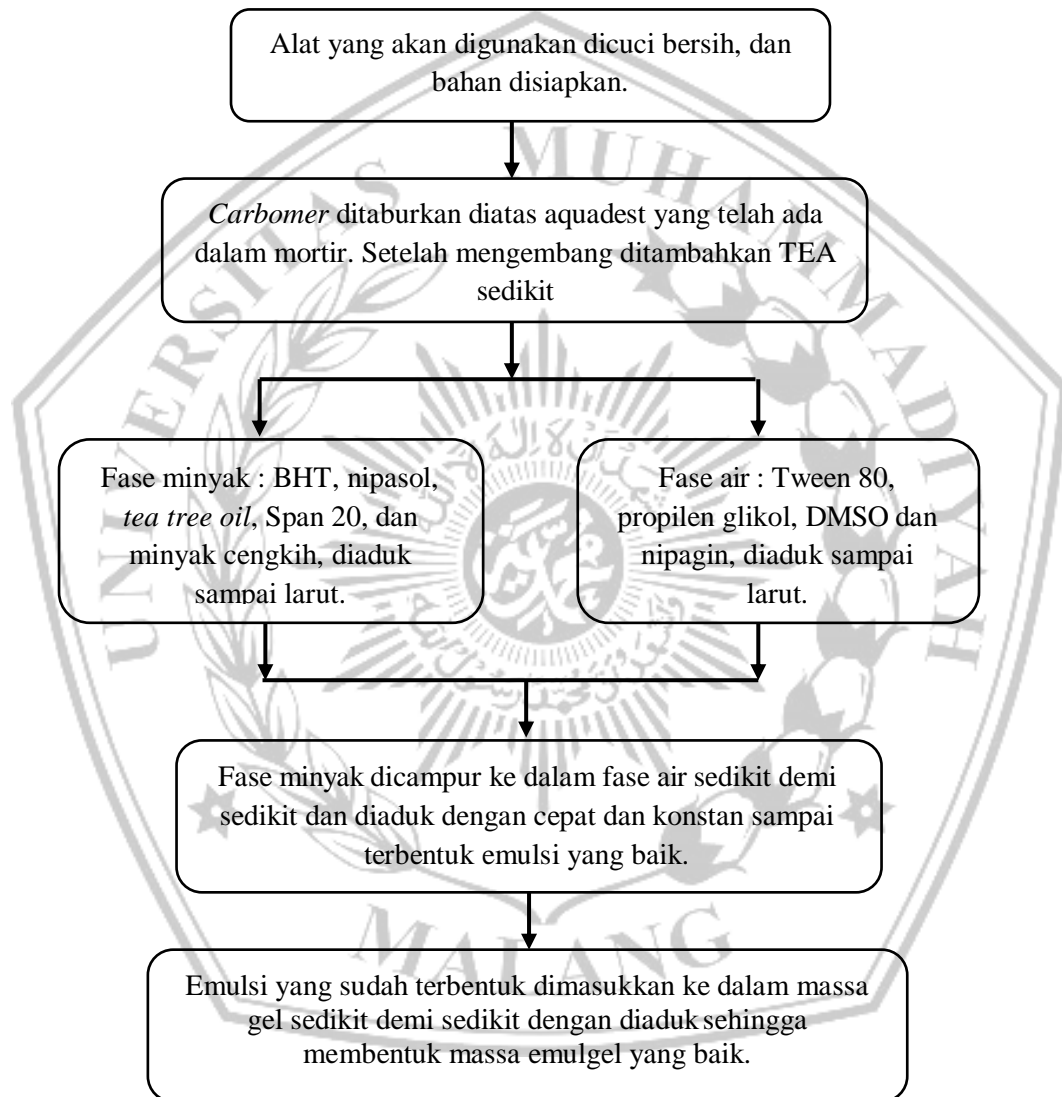
Nama Bahan	Fungsi	Rentang Penggunaan % b/b	Formula 1 (%)	Formula 2 (%)	Formula 3 (%)
Minyak cengkih	Bahan aktif	-	1	1,5	2
<i>Tea tree oil</i>	Bahan aktif	-	5	5	5
Carbomer (<i>carboxyvinyl polymer</i>)	Gelling agent	0,5 – 2	0,7	0,7	0,7
TEA (<i>triethylamine</i>)	Alkalizing agent	Ad pH netral (7)	Ad pH netral (7)	Ad pH netral (7)	Ad pH netral (7)
BHT (<i>butylhydroxytoluene</i>)	Antioksidan	0,0075-0,1	0,1	0,1	0,1
DMSO	Enhancer	≥ 80	5	5	5
Nipasol (<i>Propyl paraben</i>)	Pengawet	0,01-0,6	0,3	0,3	0,3
Span 20 (<i>Sorbitan Monolaurate</i>)	Emulgator	1-10	2,35	2,35	2,35
Tween 80 (<i>Polyoxyethylene 20 Sorbitan Monooleate</i>)	Emulgator	1-10	2,65	2,65	2,65
PG (<i>propylenglycolum.</i>)	Humektan	15	15	15	15
Nipagin (<i>Methyl paraben</i>)	Pengawet	0,02-0,3	0,05	0,05	0,05
Aquadest	Pelarut	Ad 100	72,85	72,35	71,85

4.5.1 Cara Pembuatan Emulgel

Alat yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Bahan yang akan digunakan disiapkan. *Carbomer* ditaburkan diatas aquadest yang telah ada dalam mortir. Setelah mengembang ditambahkan TEA sedikit demi sedikit diaduk hingga menjadi massa gel yang baik. Emulsi dibuat dengan fase minyak dan fase air. Fase minyak terdiri dari BHT, nipasol, *tea tree oil*, Span 20, dan minyak cengkih, diaduk sampai larut. Sedangkan fase air terdiri dari Tween 80, propilen glikol,

DMSO dan nipagin diaduk sampai larut. Setelah larut, fase minyak dicampur ke dalam fase air sedikit demi sedikit dan diaduk dengan cepat dan konstan sampai terbentuk emulsi yang baik. Emulsi yang sudah terbentuk dimasukkan ke dalam massa gel sedikit demi sedikit dengan diaduk sehingga membentuk massa emulgel yang baik.

4.5.2 Skema Pembuatan Emulgel Minyak Cengkih kombinasi *Tea Tree Oil*



Gambar 4.2 Skema Kerja Pembuatan Emulgel Minyak Cengkih dan *Tea Tree Oil*

4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Emulgel

4.6.1 Pembuatan *Muller Hinton Agar* (MHA)

Dilarutkan 40 gram Mueller Hinton Agar dengan 1000 ml aquadest.

Setelah itu sterilkan ke dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Tuang ke dalam cawan petri steril kemudian homogenkan setelah itu dinginkan sambil diputar-putar (Fatimah et al.,2006 ; Sambou *et al.*,2017).

4.6.2 Peremajaan Bakteri (Inokulasi)

Inokulasi bakteri adalah menumbuhkan bakteri dalam tabung reaksi agar yang telah dibuat. Caranya dengan diambil 1 ose bakteri dan digoreskan dimedia miring, lalu diinkubasi selama 24 jam (Against *et al.*,2015).

4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*.

Bakteri *Propionibacterium acnes* dalam penelitian ini dibuat bentuk suspensi dengan cara sebagai berikut: diambil koloni bakteri dari koloni strain murni menggunakan ose bulat steril. Lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis 0,9% steril dicampurkan hingga didapat kekeruhan yang sama dengan larutan Mc.Farland diukur secara visual (Sambou *et al.*,2017).

4.6.4 Daya Hambat Bakteri

Medium MHA di sterilkan pada suhu sekitar 40° -50° C dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 10 ml secara merata, lalu dibiarkan sampai memadat sebagai lapisan dasar atau “base layer”. Setelah memadat kemudian, suspensi bakteri dicampurkan kedalam media MHA, dituangkan 25 ml sebagai lapisan kedua atau “seed layer” sampai memadat. Selanjutnya Setelah media memadat dibuat well (sumuran) sebesar 6 mm. Sehingga terbentuklah sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji bakteri. Lalu dilakukan pemberian 50 µL emulgel minyak cengkih 1%, 1,5% dan 2% dengan *tea tree oil* 5%, kontrol positif, dan negatif pada setiap lubang. Setelah itu di inkubasi selama ±48 jam pada suhu 37°C, lalu diukur zona bening yang terbentuk dengan jangka sorong (Against et al.,2015 ; Ningsih *et al.*, 2016)

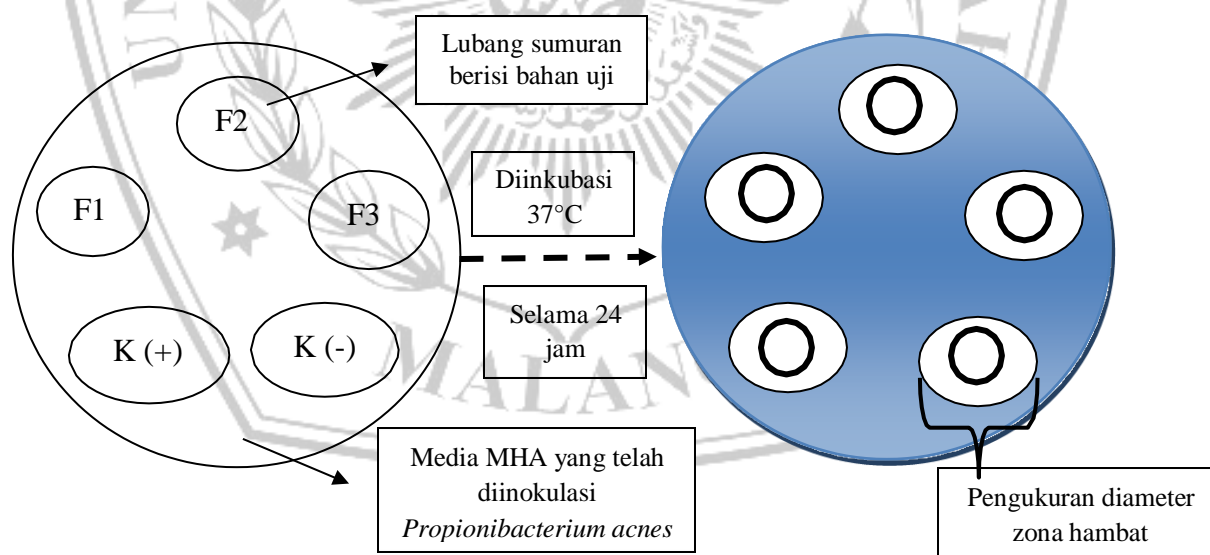
Zona bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan diameter zona hambat. Zona hambat yang terbentuk disekitar sumur diukur diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan millimeter (mm) dengan menggunakan jangka sorong dan penggaris (Susanna *et al.*, 2017). Diameter zona hambat yang dihasilkan, lalu dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

4.6.5 Kontrol positif antibakteri

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini untuk menguji aktivitas antibakteri sediaan emulgel minyak cengkih kombinasi *tea tree oil* adalah Klindamisin gel. Pemilihan antibiotik *Clindamycin* sebagai kontrol positif karena bakteri *Propionibacterium acnes* masih sensitif berdasarkan *Clinical Laboratory Susceptibility Institute* (CLSI) tahun 2016, dan dibuktikan pada hasil penelitian bahwa antibiotik clindamycin memiliki zona hambat yang besar sehingga masih dalam kategori sensitif (Marliana, Sartini and Karim, 2018). Klindamisin bekerja dengan menghambat sintesis protein dari bakteri dengan menghambat translokasi ribosom, klindamisin akan berikatan dengan 50S dari bakteri, secara khusus ia mengikat terutama ke subunit RNA 23S. Pada penelitian Sambou, Wibowo and Taurhesia (2017) diameter zona bunuh (*radical zone*) Klindamisin gel 1,2% lebih baik dalam menekan jumlah pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne*.

4.6.6 Pengamatan Daerah Hambat

Pengamatan daerah hambat dapat dilihat atau diamati dengan mengukur diameter daerah jernih (termasuk diameter lubang) di sekitar tiap-tiap lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong.



Gambar 4.1 Metode Sumuran dengan media MHA (*Muller Hinton Agar*)

4.6.7 Metode Analisis

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian statistik bertujuan untuk mengetahui diameter zona hambat yang dihasilkan apakah ada perbedaan

signifikan pada hasil penelitian dari setiap formula. Analisis dilakukan dengan menggunakan software SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Uji hipotesis menggunakan *One Way Anova* (uji hipotesis komparatif tidak berpasangan) dengan derajat kepercayaan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar formula yang berbeda bermakna. H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada perbedaan bermakna pada setiap kelompoknya. H_1 dari penelitian ini adalah ada perbedaan bermakna pada setiap kelompoknya.

